

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/37809 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: A61K 9/16,
9/51, B01J 13/00

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; Parc Club du
Moulin à Vent, 33, avenue du Docteur G. Lévy, F-69693
Cedex Vénissieux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02831

(22) Date de dépôt international:
11 octobre 2000 (11.10.2000)

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): TOURAUD,
Franck [FR/FR]; 14, rue Saint Maximin, F-69003 LYON
(FR). BRYSON, Nathan [US/FR]; 120, rue du Coteau,
F-69390 Millery (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

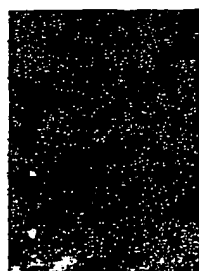
(30) Données relatives à la priorité:
99/14751 23 novembre 1999 (23.11.1999) FR

(74) Mandataires: BOULINGUIEZ, Didier etc.; Cabinet
Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09
(FR).

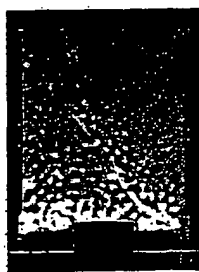
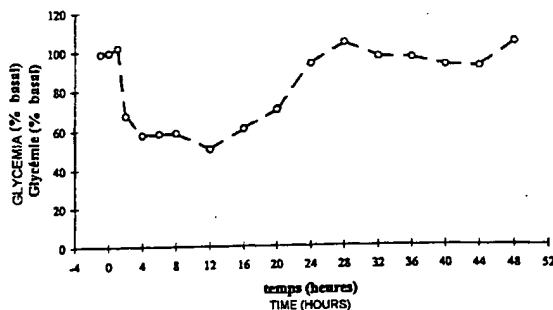
[Suite sur la page suivante]

(54) Title: COLLOIDAL SUSPENSION OF SUBMICRONIC PARTICLES AS VECTORS FOR ACTIVE PRINCIPLES AND
METHOD FOR PREPARING SAME

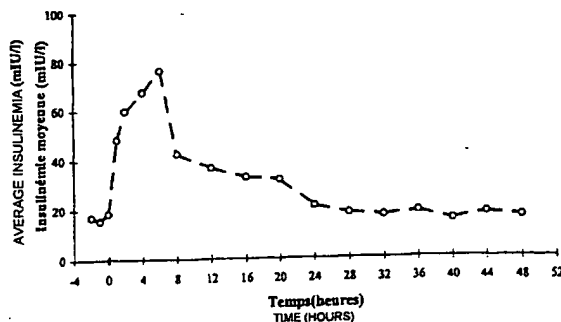
(54) Titre: SUSPENSION COLLOIDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE VECTORISATION DE PRINCIPES AC-
TIFS ET LEUR MODE DE PREPARATION



200 nm



50 nm



(57) Abstract: The invention concerns a suspension of particles as carriers (PV) for active principles (PA). Said vector particles (PV) are based on polyamino acids (PAA). They have a mean hydrodynamic diameter (Dh) ranging between 30 and 120 nm and have an insulin load factor (Ta) ranging between 5 and 25 % of associated insulin volume relative to the polyamino acid volume forming the carrier principles. The polyamino acids are double-block polymers comprising hydrophilic (AAI) and hydrophobic (AAO) monomers. The invention also concerns a solid powder substance from which are derived the carrier particles and the preparation of said solid powder substance and said suspension of carrier particles. Said preparation consists in copolymerising N-carboxy anhydrides of hydrophobic monomers and precursors of hydrophilic monomers, in the presence of N-methyl pyrrolidone

and methanol. The precursors of the hydrophilic monomers are then transformed into hydrophilic monomers by acid hydrolysis. Optionally the copolymer is neutralised, subjected to dialysis, concentrated and the water is eliminated. Thus a solid powder substance or suspended carrier particles are produced. Active principles (such as insulin or vaccines) are associated with said carrier particles for preparing special pharmaceutical products.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/37809 A1



(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé: L'invention concerne une suspension de particules de vectorisation (PV) de principes actifs (PA). Ces PV sont à base de polyaminoacides PAA. Elles ont un diamètre hydrodynamique moyen Dh compris entre 30 et 120 nm et présentent un taux de chargement Ta avec l'insuline compris entre 5 et 25 % de masse d'insuline associée par rapport à la masse de PAA formant les PV. Les PAA sont des copolymères diblocs comprenant des monomères hydrophiles AAI et hydrophobes AAO. L'invention vise, également, un solide pulvérulent à partir duquel sont issues les PV ainsi que la préparation de ce solide et de cette suspension de PV. Cette préparation consiste à copolymériser les N-CarboxyAnhydrides d'AAO et de précurseurs d'AAI, en présence de N-méthylpyrrolidone et de méthanol. On transforme ensuite des précurseurs d'AAI en AAI par hydrolyse acide. Eventuellement, on neutralise, on dialyse, on concentre et on élimine l'eau. On produit ainsi un solide pulvérulent ou des PV en suspension. On associe des PA (comme l'insuline ou des vaccins) à ces PV et on prépare des spécialités pharmaceutiques.

SUSPENSION COLLOÏDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS ET LEUR MODE DE PRÉPARATION

5 DOMAINE TECHNIQUE

Le domaine de la présente invention est celui des Particules de Vectorisation (**PV**), utiles pour l'administration de principes actifs (**PA**). Ces derniers sont, de préférence, des médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse,
10 intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc... Mais il peut s'agir aussi de produits cosmétiques ou de produits phytosanitaires, tels que des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc. En terme de nature chimique, les **PA** plus particulièrement, mais non limitativement, concernés par l'invention sont, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des
15 polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides, des polynucléides et des molécules organiques.

La présente invention concerne, plus précisément, des suspensions colloïdales de Particules de Vectorisation, avantageusement de type submicronique, à base de polyaminoacides (**PAA**). La présente invention vise aussi bien des particules nues en
20 tant que telles, que les systèmes de vecteurs de **PA**, constitués par les particules chargées par le (ou les) **PA** considéré(s). La présente invention a également trait à des solides pulvérulents comprenant ces **PV**. L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites suspensions colloïdales de particules, avec ou sans **PA**.

25

ART ANTERIEUR

L'encapsulation de **PA** dans les **PV** a notamment, pour but de modifier leur durée d'action et/ou de les acheminer au lieu du traitement et/ou augmenter la biodisponibilité desdits **PA**. De nombreuses techniques d'encapsulation ont déjà été
30 proposées. De telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport du **PA** jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse, digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du **PA** sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les **PA** concernés par ces avatars de transport et de
35 séjour dans l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autres, des molécules organiques d'origine synthétique ou naturelle.

La revue de M.J. HUMPHREY (Delivery system for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L.ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

- 5 Parmi tous les matériaux envisageables pour former des **PV**, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques. S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les **PV**, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 10 1 La première spécification recherchée pour les **PV** serait que le polymère, constituant les **PV** soit biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme. En outre, il conviendrait que la biodégradation dans l'organisme soit d'une durée suffisamment courte.
- 15 2 Les **PV** auraient avantage à pouvoir former, sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif, une suspension aqueuse stable.
- 3 Il serait également souhaitable que les **PV** aient une taille suffisamment faible pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante par un filtre dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2 µm.
- 20 4 Il est souhaitable que les **PV** et les systèmes **PV-PA** puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour le **PA**.
- 5 Les **PV** devraient, avantageusement, permettre de contrôler la vitesse de libération du **PA**.
- 25 6 Une autre spécification importante serait que les systèmes **PV-PA** puissent constituer d'excellents médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de l'administration par injection –e.g. intraveineuse ou intramusculaire– « injectabilité » se caractérise par :
 - (i) un volume injecté réduit (pour une dose thérapeutique donnée)
 - (ii) une viscosité faible.
- 30 Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose thérapeutique de **PA** est associée à une quantité minimale de **PV**. En d'autres termes, les **PV** doivent avoir un fort taux de chargement en **PA**.
- 7 Le coût propre aux **PV** dans une préparation injectable doit être réduit et là encore il convient que les **PV** aient un fort taux de chargement en **PA**.
- 35 En définitive, la faible taille et un fort taux de chargement sont des spécifications majeures recherchées pour les **PV**.

- 8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif des **PV**, n'induisse pas de réponse immunitaire.

Les propositions techniques antérieures, décrites infra, ont tenté de satisfaire
5 l'ensemble de ces spécifications. A titre d'illustration, on citera les propositions antérieures (a) à (h) :

- (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine
10 (chargée positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35 μm .
- (b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de **PA**. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles
15 techniques d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les **PA** peptidiques ou polypeptidiques.
- (c) On connaît, également, des **PV** biocompatibles appelées protéinoïdes, décrites
20 dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides,
25 puis avec un changement de pH, ils provoquent la précipitation de particules protéinoïdes. Lorsque la précipitation s'effectue en présence d'un **PA**, celui-ci est encapsulé dans la particule.
- (d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de **PA** propre à l'invention.
30 Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopiques (160 μm et de longueur égale à 2 000 μm), constitués de copolymères de copoly(aminoacides) – e.g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine) – obtenus par
35 copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA). L'inclusion d'un **PA** s'opère par une technique d'évaporation de

solvant d'un mélange de polymère et de PA. Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).

- 5 (e) La demande de brevet PCT/FR WO 97/02810 divulgue une composition pour la libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un PA absorbé sur lesdites particules. Dans ce cas, la libération du principe actif s'opère par désorption.
- 10 (f) La publication «CHEMISTRY LETTERS 1995, 707, AKIYOSHI ET AL» concerne la stabilisation d'insuline par complexation supramoléculaire avec des polysaccharides hydrophobisés par greffage de cholestérol.
- (g) L'article paru dans «MACROMOLECULES 1997, 30, 4013-4017» décrit des copolymères composés d'un bloc polypeptide à base de L-phénylalanine, 15 de (-benzyl-L-glutamate ou de O-(tétra-O-acétyl-D-glucopyranosyl)-L-sérine, et un bloc synthétique, tels que la poly(2-méthyl-2-oxazoline) ou la poly(2-phényl-2-oxazoline). Des polymères s'agrègent en milieu aqueux pour former des particules de 400 nm, capables de s'associer avec une enzyme, la lipase. La terme associée signifie ici que la protéine s'adsorbe sur la particule par un 20 phénomène physique (pas de liaison covalente).
- (h) La demande de brevet FR 2 746 035 décrit notamment page 28 lignes 3 à 16, une suspension colloïdale de microparticules gel composite obtenue à partir d'un polyaminoacide du type polypolyleucine/glutamate de sodium, huile de coco fractionnée (miglyol®) et d'eau désionisée ou de solution saline 25 tamponnée (tampon phosphate pH 7,4 à 25°C). Le diamètre moyen de référence D[4,3] de ces microparticules gel composite est de 2800 nm. Il ressort de tous les exemples du FR 2 746 035, que le plus petit diamètre moyen de référence D[4,3] est égal à 1900 nm.
- 30 Par ailleurs, ces microparticules gel composite ne peuvent pas s'associer à l'insuline à l'état non dissous en suspension colloïdale, selon un taux $Ta \geq 7\%$. Dans ces conditions, il est manifeste que les microparticules gel composite ne satisfont pas au cahier des charges, et notamment pas aux spécifications relatives à l'injectabilité et à la capacité d'association et de libération vis-à-vis de l'insuline.
- 35 En outre, le procédé selon le FR 2 746 035 ne fait pas intervenir de solvant polaire non aromatique et la formation des microparticules n'intervient pas de

manière spontanée en milieu aqueux, mais passe par la mise en oeuvre d'une homogénéisation vigoureuse à l'aide d'un dispositif du type rotor/stator.

- (i) La demande PCT WO 96/29991 a pour objet des particules de polyaminoacides utiles pour la vectorisation de PA. Ces particules ont une
5 taille comprise entre 10 et 500 nm, de préférence entre 30 et 400 nm. Dans les exemples de cette demande PCT, la taille des particules est mesurée par le rayon de giration. Le rayon de giration des particules obtenues dans ces exemples varie de 55 à 280 nm. Il existe d'autres techniques de mesure de la taille de particules colloïdales. La détermination du diamètre hydrodynamique
10 moyen (Dh) des particules par diffusion quasi élastique de la lumière (QELS) est un exemple de méthode commode de mesure. Dans tout le présent exposé, on prendra pour référence un mode opératoire Md de mesure de Dh.. Md est décrit plus loin. Ainsi, le Dh des particules selon les exemples du PCT WO 96/29991 s'étend de 150 nm à 750 nm. Il est à remarquer que les PV dont il
15 est question ici sont formées d'un coeur hydrophobe entouré d'une chevelure hydrophile. Le diamètre hydrodynamique de ces objets est inférieur au double de leur rayon de gyration, comme cela est expliqué par exemple dans les ouvrages "Dynamic Light Scattering", B.J. Berue and R. Pecaran (Wiley, 1976) and "Physicochemical Hydrodynamics", R.F Probst (Wiley 1994).
20 Le taux de chargement Ta des particules s'exprime commodément par le rapport de la masse d'insuline à la masse de PV sec. Selon les exemples du WO 96/29991, avec un PA constitué par de l'insuline, est au mieux de 0,065 mg/mg, soit 6,5 % en poids sec d'insuline par rapport à la masse de PAA. Ta est mesuré selon un mode opératoire Ma décrit plus loin.
25 Les particules selon le WO 96/29991 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent des monomères aminoacides neutres et hydrophobes AAO et des monomères ionisables et hydrophiles AAI. Ces PAA sont préparés par copolymérisation de NCA de précurseurs d'AAI (e.g. : Glu-OMe) et de NCA d'AAO (e.g. Leu)
30 en solution dans un mélange dioxane/toluène. Le copoly(Glu-OMe)(Leu) obtenu en solution est récupéré par précipitation dans l'eau, filtration et séchage. Ce copolymère est alors soumis à une hydrolyse acide en l'incorporant dans l'acide TriFluoroAcétique (TFA), dans lequel il se dissout. Un copolymère (Glu-O-Na)(Leu) est récupéré après neutralisation, dialyse,
35 filtration et lyophilisation. Ce coPAA est dispersé dans une solution aqueuse de NaCl et il se forme spontanément une suspension de nanoparticules.

Comme indiqué supra, ces dernières sont de taille D_h supérieure à 150 nm et un taux de chargement à l'insuline T_a 6,50%.

- Il ressort donc de ce qui précède que les propositions techniques antérieures sus-
- 5 décrites, et notamment la proposition (i), satisfont incomplètement aux spécifications du nouveau cahier des charges indiqué supra, et, en particulier une aptitude à la stérilisation par filtration, une haute vitesse de dégradation, une adaptabilité aux contraintes de l'administration de médicaments par injection, un faible coût et un fort taux de chargement en **PA**.
- 10 S'agissant de l'aptitude à la filtration stérilisante, il importe que les particules **PV** soient suffisamment petites pour passer, en suspension dans un liquide, au travers de filtres dont le seuil de coupure est inférieur ou égal à 0,2 μm , sans les colmater. De telles facilité et efficacité de stérilisation par filtration sont particulièrement appréciées pour des médicaments injectables.
- 15 Concernant l'aptitude à l'injection des **PV**, il convient, pour une dose donnée de **PA**, de pouvoir injecter de faibles volumes de suspension liquide, et que cette suspension soit peu visqueuse. Il s'agit de pouvoir réduire les quantités d'excipient (**PV**) par rapport à la dose thérapeutique visée en **PA** et de fournir des **PV** ayant une taille la plus réduite possible, tout en augmentant la capacité de chargement du **PA**.
- 20 S'agissant de la spécification de biodégradabilité des **PV**, elle est d'autant meilleure que la taille des **PV** est réduite et permet leur élimination rapide.
- En outre, il est appréciable de pouvoir réduire les quantités d'excipient (**PV**) pour des raisons économiques et pour améliorer la tolérance du médicament injectable.

25 EXPOSE SUCCINCT DE L'INVENTION

Dans cet état de fait, un objectif essentiel est de pouvoir fournir de nouvelles **PV** qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs ou de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables de **PV**.

- Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir de nouvelles **PV** en
- 30 suspension aqueuse colloïdale stable ou sous forme pulvérulente et à base de poly(aminoacides) (**PAA**), ces nouvelles **PV** se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 8 du cahier des charges susvisé.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de perfectionner les particules divulguées dans la demande PCT WO 96/29991.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de **PV** dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de chargement en **PA** et en termes de contrôle de cinétique de libération du **PA**.

5 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des suspensions médicamenteuses injectables. Les spécifications, requises pour de telles suspensions, sont un faible volume d'injection et une faible viscosité. Il importe que la masse de particules colloïdales par dose d'injection soit le plus faible possible et ce sans limiter la quantité du principe actif **PA** transporté par ces particules, afin de ne pas nuire à l'efficacité thérapeutique.

10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

15 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale comprenant des particules de vectorisation de principes actifs filtrable sur des filtres de 0,2 μm à des fins de stérilisation.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de PAA utiles, notamment, comme
20 vecteurs de principes actifs, ledit procédé se devant d'être, plus simple à mettre en œuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules en suspension aqueuse ou sous forme solide pour la préparation :

- 25
- de médicaments (e.g. vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, les principes actifs de ces médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des
30 polynucléotides ;
 - et/ou de nutriments,
 - et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires,
 - et/ou de molécules organiques médicamenteuses.
- 35

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir des suspensions de PV submicroniques à base de PAA et susceptibles de servir de vecteur d'un PA, en particulier médicamenteux pour l'administration dudit PA à un organisme humain ou animal, ou bien encore d'un PA nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique.

- 5 Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un système de vectorisation de vaccin, qui soit non-immunogène intrinsèquement et en combinaison avec un ou plusieurs antigènes.

Les objectifs relatifs aux produits (parmi d'autres) sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la

15 vectorisation de principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents AAI hydrophiles et AAO neutres hydrophobes, les acides aminés de
- 20 chaque type étant identiques ou différents entre eux,
- et aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée, caractérisée :
- 25
 - en ce que le ou les AAI des chaînes polymères est (sont) choisi(s) parmi les acides aminés à chaîne latérale ionisable, les acides aminés naturels Glu et Asp sous forme carboxylique et/ou sous forme de sels étant particulièrement préférés,
 - en ce que le ou les AAO des chaînes polymères est(sont) choisi(s) dans le
 - 30 groupe comprenant les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux appartenant au sous-groupe comportant : Leu, Ile, Val, Ala, Gly, Phe ;
 - en ce que les particules sont stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s),
 - par un taux de chargement Ta des particules de vectorisation avec
 - 35 l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse et mesuré selon un mode opératoire Ma, Ta étant tel que :

$7 \leq Ta$

de préférence, $8 \leq Ta \leq 50$

et, plus préférentiellement encore, $10 \leq Ta \leq 30$

- et par un diamètre hydrodynamique moyen D_h exprimé en nanomètres (nm) et mesuré selon un mode opératoire M_d , D_h étant tel que :
 $10 \text{ nm} \leq D_h \leq 150 \text{ nm}$
de préférence, $20 \text{ nm} \leq D_h \leq 100 \text{ nm}$.

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

10 Les modes opératoires M_d et M_a pour les mesures D_h et Ta sont détaillés ci-après.

Mode opératoire M_d :

15 La poudre pulvérulente de PAA est mise en suspension dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M à pH 7,4, 25 °C et à une concentration en polymère comprise entre 0,01 et 0,5 g/l et, de préférence, égale à 0,1 g/l. Cette suspension est agitée 4 heures, puis introduite dans la cellule de diffusion d'un appareil de diffusion de la lumière, de type Brookhaven, fonctionnant avec un faisceau laser de longueur d'onde 488 nm et polarisé verticalement. Le diamètre hydrodynamique est calculé à partir de la fonction d'autocorrélation du champ électrique par le méthode des cumulants, comme décrit dans l'ouvrage « Surfactant Science Series » volume 22, Surfactant Solutions, Ed. R. Zana, chap. 3, M. Dekker, 1984.

Mode opératoire M_a :

- 25 (a) Préparation d'une solution aqueuse d'insuline : De l'insuline recombinante humaine lyophilisée (Sigma n° 10259) est versée dans une solution HCl 0,1 N durant 5 min à 25°C. Cette solution est ensuite versée dans une solution de tampon phosphate qui est finalement neutralisée par ajout de NaOH de 0,1 N. La solution est laissée ensuite au repos 30 min à température ambiante, puis filtrée sur membrane acrodisc 0,8-0,2 μ . La masse d'insuline est calculée en fonction du volume souhaité de solution, afin d'obtenir une concentration de 60 UI/ml.
- 30 (b) Dispersion des particules de vectorisation en PAA à associer dans la solution d'insuline : Les PV lyophilisés sont ajoutés à la solution d'insuline, à raison de 10 mg PV/ml de solution. Ce mélange est agité au vortex à deux ou trois reprises, puis placée dans un agitateur à basculement
- 35

à température ambiante pendant 18 heures. La suspension colloïdale est ensuite conservée à 4°C.

- 5 (c) Séparation de l'insuline libre de l'insuline associée et dosage de l'insuline libre : La solution, contenant l'insuline et les **PV** est centrifugée 1 heure sous 60 000 g à 20°C. Le surnageant est disposé dans des tubes munis d'une membrane d'ultrafiltration (seuil de coupure 100 000Da) et centrifugé sous 3 000 g, 2 heures à 20°C. L'insuline dans le filtrat est dosée par CLHP.

10 L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules de vectorisation **PV**, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un groupe de polymères et d'une méthodologie originale permettant d'obtenir des particules de taille submicronique, qui forment une suspension colloïdale aqueuse stable en l'absence de tensioactifs ou de solvants.

15 Un autre fondement inventif de ces nouvelles particules de vectorisation **PV**, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un groupe de particules structurées submicroniques particulières par leur taux de chargement $Ta \geq 7\%$ et leur taille $Dh \leq 150$ nm. Cette sélection est le fruit d'importantes et longues recherches sur le procédé d'obtention des particules. En effet, la réduction de taille et l'augmentation de la capacité de chargement des

20 particules de polyaminoacides n'étaient, à priori, pas évidentes. Ainsi, en mettant en œuvre le procédé d'obtention de nanoparticules de polyaminoacide enseigné dans la demande PCT WO 96/29991, l'homme de l'art n'a pas pu obtenir, « sur mesure », des particules qui répondent au nouveau cahier des charges, tel que défini supra.

25 Finalement, c'est en jouant sur les compositions des polymères et sur les conditions opératoires que les inventeurs ont pu isoler ces particules structurées de très petite taille qui sont à la base de PAA et qui présentent, de manière tout à fait surprenante et inattendue, une capacité de chargement Ta à l'insuline qui peut être jusqu'à trois fois supérieure à celle propre aux particules selon le WO 96/29991.

30 Avantageusement, la suspension selon l'invention est caractérisée en ce que les particules submicroniques ne tirent pas leur cohésion de la présence des trois composés suivants :

- I) huile
- II) phase aqueuse .

- III) et au moins un copolyaminoacide linéaire non réticulé synthétique et comportant au moins deux types différents de comonomère aminoacide AAI hydrophile et AAO hydrophobe,
contrairement à la suspension de microparticules selon la demande de brevet FR
5 2 746 035.

La structure des polymères PAA et la nature des acides aminés, sont choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de
10 particules (PV) de petite taille,
- les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique,
- les PV s'associent avec des protéines ou autres PA en milieu aqueux, par un mécanisme spontané et non dénaturant pour la protéine,
- 15 • les PV libèrent les PA en milieu physiologique et, plus précisément, in vivo ; la cinétique de libération est fonction de la nature du polymère PAA précurseur des PV.

Ainsi, en jouant sur la structure particulière du PAA, on peut contrôler les phénomènes
20 d'association et de libération du PA sur le plan cinétique et quantitatif.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir choisi, à titre de matériau constitutif des PV, une composition particulière de polyaminoacides qui sont amphiphiles et qui, donc, possèdent des propriétés des PV en PAA, à savoir :

- possibilité de former spontanément des suspensions colloïdales de PV
25 compatibles avec le pH des milieux physiologiques rencontrés dans les applications thérapeutiques visées,
- association spontanée des PA avec des PV en l'absence d'autre agent que l'eau qui leur sert de solvant et qui, dans le cas des protéines, n'est pas dénaturant,
- 30 • possibilité de libérer le PA du complexe d'association PA-PV, dans des conditions physiologiques, avec des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique, qui laissent présager des utilisations intéressantes dans le domaine thérapeutique (vectorisation PA),

et qui, par ailleurs, présentent de nouvelles propriétés qui sont :

- 35 • filtrabilité avec seuil de coupure inférieur ou égal à 0,2 μm à des fins de stérilisation,

- biodégradabilité améliorée,
- aptitude à l'injection optimisée.

5 Ces nouvelles propriétés ont pu être obtenues grâce aux fonctions techniques primaires des **PV** qui sont la petite taille nanométrique et le fort taux de chargement.

Pour définir un peu plus ces PAA, on peut indiquer qu'ils peuvent être du type ordonné, séquentiel alterné (blocs) ou du type désordonné, séquentiel aléatoire (statistique).

10 Ainsi, selon une première forme de réalisation des **PV** selon l'invention, les PAA constitutifs sont du type « bloc » et sont caractérisés par un rapport molaire AAO/(AAI+AAO) tel que :

- $10\% \leq \text{AAO}/(\text{AAO} + \text{AAI}) \leq 70\%$,
- de préférence, $20\% \leq \text{AAO}/(\text{AAI} + \text{AAO}) \leq 60\%$,
- et plus préférentiellement encore, $35\% \leq \text{AAO}/(\text{AAI} + \text{AAO}) \leq 50\%$.

15 Avantageusement, la longueur absolue de chaque bloc d'AAO, exprimé en nombre d'AAO est telle que :

- de préférence, $\text{AAO} > 10$,
- et, plus préférentiellement encore, $20 \leq \text{AAO} \leq 100$.

20 Selon une deuxième forme de réalisation des **PV** selon l'invention, les PAA constitutifs sont du type « statistique » c'est-à-dire préparés par copolymérisation simultanée de monomères de AAI et AAO, et le rapport molaire AAO/(AAO + AAI) est tel que :

- $\text{AAO}/(\text{AAO} + \text{AAI}) > 10\%$,
- et, de préférence, $\text{AAO}/(\text{AAO} + \text{AAI}) \geq 20\%$,
- 25 • et, plus préférentiellement encore, $30\% \leq \text{AAO}/(\text{AAI} + \text{AAO}) \leq 70\%$.

Avantageusement, la masse molaire M_w de ces PAA statistiques est telle que :

- $M_w \geq 2\,000 \text{ g/mol}$,
- de préférence, $M_w \geq 5\,500 \text{ g/mol}$,
- 30 • et plus, préférentiellement encore, $5\,500 \text{ g/mol} \leq M_w \leq 200\,000 \text{ g/mol}$.

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, les PAA blocs ou statistiques constitutifs de particules ont des degrés de polymérisation DP compris entre 30 et 600, de préférence entre 50 et 200 et, plus préférentiellement encore, entre 60 et 150.

35 Avantageusement, les PAA constitutifs des particules **PV** sont des PAA « diblocs ».

La présente invention vise, non seulement des suspensions de particules nues, telles que définies ci-dessus, mais également des particules comprenant au moins un principe actif **PA**. De préférence, la suspension selon l'invention est aqueuse et stable. Ces particules, chargées ou non en **PA**, sont, avantageusement, sous forme dispersée dans un liquide (suspension), de préférence aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de **PV** telle que définie ci-dessus.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne, outre une suspension colloïdale (de préférence aqueuse) de **PV**, un solide pulvérulent comprenant des **PV** et obtenu à partir de la suspension selon l'invention.

Un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la préparation des particules sélectionnées (telles que décrites ci-avant), aussi bien sous forme de suspension colloïdale que sous forme de solide pulvérulent. Le procédé de préparation considéré consiste, essentiellement, à synthétiser des PAA précurseur et à les transformer en particules structurées.

Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s), ces particules étant des arrangements supramoléculaires discrets :

- à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles linéaires, à enchaînements (-AAI hydrophiles et AAO hydrophobes, les aminoacides de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;
- de diamètre moyen D_h , exprimé en nm et mesuré selon un mode opératoire M_d , tel que :
 $10 \leq D_h \leq 150$
de préférence, $20 \leq D_h \leq 100$;
- d'une part aptes, à former une suspension colloïdale stable par un simple mélange dans un milieu aqueux, sans qu'il soit nécessaire d'y ajouter un solvant ni de tensioactifs ;
- et d'autre part, aptes à s'associer dans un milieu liquide, avec au moins un **PA** et, en particulier, avec l'insuline selon un taux de chargement T_a , exprimé en %, et mesuré selon un mode opératoire M_a tel que : $7 \leq T_a$, de préférence, $8 \leq T_a \leq 25$, et, d'autre part, à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et contrôlée.

Ce procédé est caractérisé en ce que :

1. on réalise une copolymérisation de monomères N-CarboxyAnhydrides d'aminoacides (NCA) d'au moins deux types différents, d'une part, des NCA-pAAI («pAAI» désignant un précurseur d'AAI) et, d'autre part, des NCA-AAO, en présence :
 - d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiméthylSulfoxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone, la NMP étant plus particulièrement préférée,
 - et, éventuellement d'au moins un co-solvant protique de préférence choisi dans le groupe comprenant la pyrrolidone, l'eau, les alcools ; le méthanol étant particulièrement préféré ;
 2. on transforme les motifs récurrents pAAI du copolymère précurseur PAA des particules, en motifs récurrents AAI, en mettant en œuvre une hydrolyse, de préférence acide, pour laquelle on ajoute au milieu organique susdécrit une phase aqueuse acide;
 3. éventuellement on neutralise le milieu réactionnel ;
 4. éventuellement on purifie le milieu réactionnel par dialyse pour obtenir une suspension aqueuse de particules structurées ;
 5. éventuellement on concentre cette suspension ;
 6. éventuellement on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.
- La première étape du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-(-aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article « Biopolymers, 15, 1869 (1976) » et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF « (-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and Related Heterocycles » Springer Verlag (1987). La mise en œuvre de solvants de copolymérisation aprotiques non aromatiques polaire, judicieusement choisis, en évitant toute précipitation et le fait d'avoir recours à une hydrolyse acide en présence d'eau et de solvant organique polaire non aromatique, constituent des modalités nouvelles et inventives qui conduisent à des particules structurées, discrètes et submicroniques à forte capacité de chargement de PA, et qui forment une suspension colloïdale, stable en milieu aqueux. Ces particules ne sont nullement comparables à un précipité aggloméré macroscopique du genre de celui évoqué ci-avant à propos de la proposition antérieure (d).

- Suivant une variante, à l'issue de l'étape 1, on précipite – de préférence dans l'eau – le copolymère poly(AAO)(pAAI) obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le copolymère poly(AAO)(pAAI) sous forme de précipité formant un produit intermédiaire stable. Ce précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.
- De manière plus préférée encore, les NCA-pAAI sont des NCA d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé, par exemple des NCA-Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle – Et = Ethyle – Bz = Benzyle).
- De manière connue, la copolymérisation se déroule à une température comprise entre 20 et 120°C, à pression atmosphérique et en présence d'un initiateur aminé, e.g. : NH_3 . D'autres paramètres expérimentaux, comme la concentration en NCA et/ou polymère dans le solvant polaire non aromatique (de préférence le NMP), et/ou la concentration ou la nature du cosolvant protique, lors de la synthèse, seront ajustés selon les effets désirés et connus de l'homme de l'art.
- L'hydrolyse acide (étape 2) est réalisée à l'aide d'eau et d'au moins un acide minéral, tel l'aide phosphorique ou chlorhydrique – ce dernier étant préféré – et/ou un acide organique, tel l'acide TriFluoroAcétique (TFA), l'acide acétique, l'acide dichloroacétique, ou les acides organosulfoniques.
- Les proportions eau/acide -exprimées en parties en poids- dans une phase aqueuse acide d'hydrolyse sont, avantageusement :
- de 60/1 à 2/1,
 - de préférence 40/1 à 2/1,
 - et, plus préférentiellement encore, 20/1 à 2/1.
- Les proportions phase aqueuse acide d'hydrolyse/NMP – exprimées en parties en poids- sont, avantageusement :
- de 5/100 à 200/100
 - de préférence, 10/100 à 100/100
 - et, plus préférentiellement encore, de 20/100 à 80/100.
- D'autres paramètres, comme la concentration en polymère, la température du mélange réactionnel, le mode d'ajout de la phase aqueuse acide d'hydrolyse, l'emploi de pression réduite, la durée de la réaction, etc... ; sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.
- La neutralisation (étape 3) s'opère, en pratique, par exemple à l'aide de soude.

On élimine ensuite le sel formé à l'issue de la neutralisation, ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse) (étape 4), filtration, modification pH, chromatographie...

5 Cela conduit à une suspension aqueuse de particules structurées qui peut être concentrée, par exemple par distillation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation.

Pour séparer, à l'étape 6, les particules de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par exemple par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation.

10 On récupère, à l'issue de cette étape 6, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

Selon une variante, l'étape de concentration peut être réalisée par un traitement chimique, tel qu'un abaissement du pH, qui transforme en acide la partie hydrophile des monomères glutamates, ce qui les rend insolubles dans l'eau. Ces intermédiaires PAA

15 acides peuvent être filtrés, lavés et séchés. Lesdits intermédiaires acides peuvent être neutralisés avec une base chimique dans une étape ultérieure afin d'obtenir une suspension de particules.

Il est à noter que la mise en œuvre des étapes 1, 2, 3, 4 et éventuellement 5 du procédé ci-dessus correspondant à une préparation d'une suspension colloïdale de particules submicroniques et à fort taux de chargement avec les **PA**.

20 Lors de cette préparation de suspension colloïdale, les PAA amphiphiles poly(AAO)(AAI) de l'étape 2 sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des AAI est soluble et au moins une partie des AAO est insoluble. Les PAA existent sous forme de nanoparticules dans ce milieu aqueux.

25 Une alternative pour préparer la suspension de **PV** selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus et en tant que produit et par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, non solvant des AAO.

30 Pour effectuer l'association d'un ou plusieurs **PA** aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention. Des exemples, non limitatifs, de ces méthodes sont énumérés ci-après.

Selon une première méthode, on effectue l'association de **PA** aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le **PA** avec la suspension colloïdale de particules.

35 Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du **PA** aux particules par mise en présence d'un **PA** à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules. Le **PA**

solide peut être, par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (PAA), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase
5 liquide (aqueuse ou non) contenant le PA.

Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec le PA sous forme solide. On disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

10 Dans toutes ces méthodes, le PA utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à l'invention,
15 contrôler la taille des particules et atteindre des valeurs de Dh entre 25 et 100 nm, est un atout important.

La présente invention vise, également, de nouveaux produits intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAA
20 précurseurs de particules.

APPLICATION INDUSTRIELLE

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent, tels que définis ci-dessus et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté
25 supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif, choisi, de préférence, parmi :

- les vaccins,
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les
30 interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse,
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou
35 d'ADN,

- des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes,
- et leurs mélanges.

5

L'invention vise, également, une suspension et/ou le solide pulvérulent chargé(s) en **PA** nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique.

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou
10 du solide pulvérulent chargé(s) en **PA** et tels que définis ci-dessus.

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces **PV** (en suspension ou sous forme solide) chargées en **PA**, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de **PA**.

Dans le cas de médicaments, il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de
15 préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un **PA** associé aux **PV** selon l'invention et applicables par voie transdermique.

20 Les produits phytosanitaires concernés peuvent être, par exemple, des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc...

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en principes actifs, de même qu'ils
25 présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1 : Nanoparticules correspondant à un copolymère bloc Ia : leucine 50/Glutamate 50 obtenues selon l'enseignement du brevet WO 96/29991.

30

Fig. 2: Nanoparticules obtenues avec le copolymère bloc selon la présente invention (exemple 2) . On notera que la barre ne représente plus ici que 50 nm.

Fig 3 Evolution de la concentration en glucose (moyenne en % basal sur 4 chiens)
35 après injection d'une formulation de **PV** chargée en insuline à raison de 2 UI/kg.

Fig. 4 Evolution de la concentration en insuline sérique (moyenne sur 4 chiens) après injection d'une formulation de **PV** chargée en insuline à raison de 2 UI/kg.

5 EXEMPLES

EXEMPLE 1 -Obtention, en suspension aqueuse colloïdale stable et sous forme solide pulvérulente, de particules de vectorisation, à partir d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/Glu) 40/80 dibloc

- 10 Dans un réacteur de 1 litre thermostaté à 20°C, on introduit sous agitation 112,4 g de NCA-GluOMe (0,60 mole) et 449 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 21,38 g d'une solution d'ammoniac 0,34 M dans le dioxanne-1,4 (1,25% molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure du dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration
- 15 caractéristiques des NCA à 1860 et 1790 cm⁻¹. Après 30 min, on introduit une solution de 47,17 g de NCA Leucine (0,30 mole) dans 631 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60°C. La polymérisation est suivie comme précédemment et est complète après 2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu est augmentée à 80°C. A 350 g du mélange réactionnel obtenu en fin de
- 20 l'étape 1 sont ajoutés 31,5 g d'acide chlorhydrique concentré aqueux (35%, 12M) sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite régulée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de 31,5 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 126 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mBar pendant 18 heures. Dans cet exemple, la ratio global Eau/Acide chlorhydrique pur est de 7,6/l en masse et le ratio phase aqueuse acide/NMP de 60/100
- 25 en masse.

- Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50°C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35 % de la masse). La NMP et le chlorure de sodium formé lors de la neutralisation sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de
- 30 MWCO de 1000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient ainsi une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.

- Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du proton (signaux à 2,10, 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu).
- 35 La diamètre hydrodynamique moyen (Dh) est 70 nm (selon Md).

EXEMPLE 2 - Association de l'insuline aux nanoparticules de poly(Leu/Glu) 40/80

On met en œuvre le mode opératoire Ma. La concentration d'insuline libre, dosée par chromatographie CLHP, est égale à 0,59 mg/ml et on en déduit la concentration d'insuline associée égale à 1,51 mg/ml. La capacité de chargement d'une solution colloïdale de 10 mg/ml atteint 1,51 mg/ml d'insuline. Ainsi le rapport de la masse d'insuline associée à la masse bLE (Ta) est de 15,1 %.

EXEMPLE 3- Obtention, en suspension aqueuse colloïdale stable et sous forme solide pulvérulente, de particules de vectorisation à partir d'un PAA bloc poly(Leu/glu) 25/70 dibloc.

146,4 g de NCA GluOMe sont dissous dans 586g de NMP auxquels sont ajoutés 18,43 g d'une solution d'ammoniac 0,48 M dans le méthanol. Lorsque la polymérisation des NCA GluOMe est complète, une solution de 43,9 g de NCA Leu dans 708 g de NMP est introduite et la polymérisation des NCA Leu est poursuivie jusqu'à disparition des monomères. Le milieu est alors porté à 80°C et on y ajoute, en goutte à goutte, durant 30 min à 1 heure, 129,4 g d'HCl 35 %. Un vide de 600 mBar est appliqué pendant 6 heures, puis 129,4 g d'HCl 35 % supplémentaires sont ajoutés en mélange avec 517,5 g d'eau. Un vide de 250 mBar est alors appliqué pendant 18 heures. Après cette étape, la température est réduite à 50°C, 1 litre d'eau est introduit, suivi de 280 ml de NaOH 35 % pour ramener le pH à 7,4. La suspension est ensuite filtrée (5 µm), dialysée (seuil de coupure 1 000 Da) dans de l'eau, pour éliminer le solvant et les sels, et enfin filtrée (0,22 µm). Cette suspension peut être utilisée directement ou subir des traitements ultérieurs, tels que la distillation de l'eau (étape 5) ou la lyophilisation (étape 6). Le diamètre hydrodynamique moyen Dh (selon Md) est 14,8%. Le taux de chargement Ta de l'insuline, déterminé selon le mode opératoire Ma, est 35 nm.

EXEMPLE 4 - Obtention, en suspension colloïdale aqueuse stable, de nanoparticules de vectorisation, à partir d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/Glu) 50/70 dibloc et caractéristiques des nanoparticules

Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30°C, on introduit sous agitation 38,9 g de NCA-GluOMe (0,208 mole) et 156 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 5,79 g d'une solution d'ammoniac 0,407 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure du dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA à 1860 et 1790 cm⁻¹. Après 30 min, on introduit une solution

- de 23,3 g de NCA Leucine (0,148 mole) dans 263 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60°C. La polymérisation est suivie comme précédemment et est complète après 1-2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80°C. 41,9 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite réglée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de 41,9 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 167,5 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mBar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50°C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35 % de la masse). La NMP et le chlorure de sodium formés lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de MWCO de 1 000 Daltons (système Pellicon II. Millipore). On obtient ainsi une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.
- Le diamètre hydrodynamique moyen D_h est mesuré selon Md sur des suspensions aqueuses des lyophilisats. Le taux de chargement Ta de l'insuline est déterminé selon le mode opératoire Ma.

EXEMPLE 5 Obtention, en suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation, à partir d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/Glu) 25/35 dibloc et caractéristiques des nanoparticules

- Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30°C, on introduit sous agitation 38,9 g de NCA-GluOMe (0,208 mole) et 156 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 5,78 g d'une solution d'ammoniac 0,452 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure de dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA à 1860 et 1790 cm^{-1} . Après 30 min, on introduit une solution de 23,3 g de NCA Leucine (0,149 mole) dans 5 219 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60°C. La polymérisation est suivie comme précédemment. Elle est complète après 1-2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80°C. 42,0 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite réglée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de 42,0 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 167,9 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 Mbar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50°C, puis neutralisé par la

soude aqueuse (35% de la masse). La NMP et le chlorure de sodium formés lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de MWCO de 1000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.

Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du proton (signaux à 2,10, 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu). Le diamètre hydrodynamique moyen D_h est mesuré selon Md sur des suspensions aqueuses des lyophilisats. Le taux de chargement de l'insuline est déterminé selon Ma.

EXEMPLE 6 Obtention, en suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation, d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/glu) 50/150 dibloc et caractéristiques des nanophases

Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30°C, on introduit sous agitation 46,4g de NCA-GluOMe (0,248 mole) et 186 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 6,90g d'une solution d'ammoniac 0,19 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure du dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA de 1 860 et 1 790 cm⁻¹. Après 30 min, on introduit une solution de 12,97g de NCA Leucine (0,083 mole) dans 218 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60°C. La polymérisation est suivie comme précédemment. Elle est complète après 1-2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80°C. 40,3 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite régulée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de 40,3 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 161,3 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mBar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50°C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35 % de la masse).

La NMP et le chlorure de sodium formé lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de NWCO de 1 000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanophases est finalement lyophilisée.

Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du proton (signaux à 2,10 ; 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu). Le diamètre hydrodynamique moyen D_h est mesuré selon Md. Le taux de chargement de l'inuline est déterminé selon Ma.

5

EXEMPLE 7 Exemple comparatif de la nature des particules formées avec l'enseignement du brevet PCT WO 96/29991

Les particules obtenues par l'enseignement du brevet WO 96/29991 sont celles apparaissant sur la Fig. 1. Avantagusement, les particules selon l'invention sont celles
10 apparaissant sur la Fig. 2 annexée correspondant à une photographie prise au microscope électronique à transmission.

Les différences de morphologie et de taille apparaissent de manière flagrante en comparant la Fig. 1 qui représente des PV selon l'art antérieur, d'une part, et la Fig. 2 montrant des PV selon l'invention, d'autre part. On constate ici une différence notable
15 de morphologie. Les PV de la Fig. 2 sont telles que la majorité des particules plus grande taille présente une forme allongée.

EXEMPLE 8- Test de Stabilité d'une suspension colloïdale préparée selon l'exemple 2 avec le polymère poly(Leu/Glu) 40/80

20 La poudre pulvérulente de l'exemple 2 est dissoute à raison de 60 mg/ml de poudre dans un tampon phosphate. Le pH a été ajusté à 7.3 et l'osmolalité de la suspension a été ajustée à 300 mOsm/kg à l'aide d'une solution de NaCl 5M. La solution a été filtrée (0.22 μ m) avant d'être réparties à raison de 5ml en flacons stériles de 10ml. La stabilité des échantillons a été évaluée sur une durée de 4 mois. La moitié des échantillons a été
25 gardée à 4°C (\pm 2°C) pendant que les autres échantillons sont maintenus à la température du laboratoire : 25°C (\pm 5°C). A des temps déterminés les échantillons sont prélevés du lieu de stockage et équilibrés 1 heure à température ambiante avant l'analyse. Les méthodes analytiques sont détaillées, les résultats étant présentés sous forme de deux tableaux.

30

1) Vérification de l'homogénéité de la solution colloïdale: Sans agiter la suspension, on effectue trois prélèvements de 100 μ l de façon à représenter l'état de la solution en haut, au milieu et en bas du flacon. L'indice de réfraction de chaque prélèvement est mesuré à 25°C sur un réfractomètre d'Abbe étalonné par rapport à l'eau pure. Trois lectures
35 sont réalisées pour chaque prélèvement et l'on compare les trois moyennes. Toute

variation de concentration de la solution se traduirait par une différence de l'indice de réfraction.

- 2) Mesure du diamètre hydrodynamique: Un prélèvement de 100 µl de la solution à analyser est dilué 120 fois par une solution de NaCl 0.15M et le Dh des particules colloïdales est mesuré selon le protocole Md.

- 3) Mesure de la viscosité: Les mesures sont réalisées sur des prélèvements de 0.75 ml à l'aide d'un rhéomètre AR1000 (TA instruments) équipé d'une géométrie Cône/Plan (cône 4 cm/2°C) à une température de 20.0°C +/-0.1°C (régulation par effet Pelletier). La courbe viscosité en fonction du gradient de cisaillement est enregistrée pour des gradients variant de 1 à 100 s⁻¹. A ces concentrations les solutions sont légèrement rhéofluidifiantes et la valeur de viscosité retenue est prise pour un gradient de 10 s⁻¹.

- 15 Les résultats obtenus après vieillissement à 4°C et 25°C sont rassemblés dans les tableau I et II.

Tableau I - Vieillissement à 4°C

		T o	T1	T2	T3	T4	T5
nombre de jours en vieillissement		0	9	28	59	92	127
homogénéité (indice)	prélèvement 1 cm	1.3443	1.3442	1.3447	1.3438	1.3440	1.3443
	prélèvement 1.5 cm	1.3442	1.3442	1.3446	1.3439	1.3439	1.3440
	prélèvement 2 cm	1.3443	1.3442	1.3448	1.3439	1.3440	1.3440
diamètre hydrodynamique (nm)		45	45	44	43	44	44
viscosité (mPa.s)		246	246	250	250	262	250

20 Tableau II - Vieillissement à 25°C

		T o	T1	T2	T3	T4	T5
nombre de jours en vieillissement		0	9	28	59	92	127
homogénéité (indice)	prélèvement 1 cm	1.3443	-	1.3448	1.3441	1.3440	1.3442
	prélèvement 1.5 cm	1.3442	-	1.3448	1.3441	1.3440	1.3442
	prélèvement 2 cm	1.3443	-	1.3447	1.3441	1.3440	1.3442
diamètre hydrodynamique (nm)		45	-	44	44	45	46
viscosité (mPa.s)		246	-	246	250	284	240

EXEMPLE 9- Test de Libération d'insuline chez l'animal après administration d'une Suspension de Particules contenant de l'Insuline

Une formulation est préparée à partir de **PV** (de l'exemple 3) et d'insuline, les quantités de chaque étant déterminées d'après les mesures de taux d'association (Ma).

Une groupe de 4 chiens beagle (mâles et femelles) pesant entre 10 et 12 kg sont mis à jeun 18 heures. Une préparation est formulée et se compose de 80 UI d'insuline et 56 mg de **PV** dans 1 ml de tampon PBS. Les chiens reçoivent ensuite une administration sous-cutanée de cette préparation d'insuline à raison de 2 UI/kg de poids. Le sang prélevé pour un dosage du glucose et d'insuline avant (-2h, -1h et 0h) et après (1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h, 44h, 48h) l'injection. Les concentrations en glucose sont mesurées dans les prélèvements par la méthode glucose-oxydase et l'insuline sérique est dosée en utilisant une méthode radio-immunologique. La Fig. 3 donne la moyenne de l'évolution du glucose pour cette formulation. La fig. 4 donne la moyenne de l'évolution de l'insuline sérique pour cette formulation.

Cet exemple montre, au travers de l'activité biologique, la non dénaturation de la protéine ainsi que la possibilité de prolonger la libération de > 24h, deux aspects avantageux de la présente invention.

REVENDICATIONS :

- 1 - Suspension colloïdale de particules submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules
- 5 étant des arrangements supramoléculaires individualisés :
- à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements α -peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'aminoacides récurrents AAI hydrophiles et AAO neutres hydrophobes, les aminoacides de chaque type étant identiques ou différents entre eux,
 - 10 • et aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée, caractérisée :
 - en ce que le ou les AAI est(sont) choisi(s) parmi des aminoacides à chaîne latérale ionisable, les aminoacides naturels Glu et Asp sous forme
 - 15 carboxylique et/ou sous forme de sels étant particulièrement préférés,
 - en ce que le ou est AAO est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant les aminoacides neutres naturels, de préférence ceux appartenant au sous-groupe comportant : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe ;
 - en ce qu'elle est stable à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de
 - 20 tensioactif(s),
 - par un taux de chargement Ta avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse et mesuré selon un mode opératoire Ma, Ta étant tel que :
$$\Delta 7 \leq Ta,$$
 - 25 Δ de préférence, $8 \leq Ta \leq 50$,
$$\Delta \text{ et, plus préférentiellement encore, } 10 \leq Ta \leq 30,$$
 - et par un diamètre hydrodynamique moyen Dh exprimé en nm et mesuré selon un mode opératoire Md, Dh étant tel que :
$$\Delta 10 \text{ nm} \leq Dh \leq 150 \text{ nm},$$
 - 30 Δ de préférence, $20 \text{ nm} \leq Dh \leq 100 \text{ nm}.$

2 - Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce que les particules submicroniques ne tirent pas leur cohésion de la présence des trois composés suivants :

- I) huile
- II) phase aqueuse
- 5 - III) et au moins un copolyaminoacide linéaire non réticulé synthétique et comportant au moins deux types différents de comonomère aminoacide AAI hydrophile et AAO hydrophobe.

3 - Suspension selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les PAA
10 constitutifs des particules sont des PAA « blocs » pour lesquels le rapport molaire AAO(AAI+AAO), exprimé en %, est tel que :

$$\Delta 10\% \leq \text{AAO}/(\text{AAI}+\text{AAO}) \leq 70 \%,$$

$$\Delta \text{ de préférence, } 20 \% \leq \text{AAO}/(\text{AAI}+\text{AAO}) \leq 60 \%,$$

et pour lesquels le degré de polymérisation DP de la chaîne est compris entre 30 et 600,
15 de préférence entre 50 et 100 et, plus préférentiellement encore, entre 60 et 150.

4 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les PAA constitutifs des particules sont des PAA « diblocs ».

20 5 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.

6 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les particules comprennent au moins un principe actif PA.

25

7 - Solide pulvérulent, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8 - Procédé de préparation du solide pulvérulent selon la revendication 7,
30 caractérisée en ce que :

- 1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'au moins deux types différents, d'une part, des NCA-pAAI (« pAAI » désignant des précurseurs d'AAI) et d'autre part, des NCA-AAO, en présence :
 - 5 - d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfOxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférée ;
 - 10 - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant particulièrement préféré ;
- 2) On transforme les motifs récurrents pAAI du copolymère obtenu à l'étape 1 en motifs récurrents AAI en mettant en œuvre une hydrolyse – de préférence acide – pour laquelle on met en présence le copolymère obtenu à l'étape 1 avec une phase aqueuse d'hydrolyse acide + eau ;
 - 15 3) on neutralise le milieu réactionnel ;
 - 4) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;
 - 20 5) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 4 ;
 - 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.
- 25 9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que, à l'issue de l'étape 1, on précipite – de préférence dans l'eau – le copolymère poly (AAO)(pAAI) obtenu et on recueille le précipité.
- 30 10 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on met en présence d'un milieu aqueux non solvant des AAO, le solide pulvérulent selon la revendication 7 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 8.

11 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 1, 2, 3, 4 et éventuellement 5 du procédé selon la revendication 8.

5 12 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on effectue l'association de PA aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant le PA avec la suspension colloïdale de particules.

10 13 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.

15 14 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 7 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 8, avec une phase liquide contenant le PA.

20 15 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 7 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 8, avec le PA sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

25 16 - Produits intermédiaires du procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAA précurseurs de particules.

17 - Suspension selon la revendication 6 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 7 comprenant un moins un principe actif choisi, de préférence, parmi :

- 30 ○ les vaccins,
 ○ les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les

- interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse,
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
 - 5 ○ les acides nucléiques et , préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,
 - des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes,
 - 10 ○ et leurs mélanges.

18 - Suspension selon la revendication 6 et/ou suspension obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, et/ou solide pulvérulent selon la revendication 7, comprenant au moins un principe actif nutritionnel, phytosanitaire ou

15 cosmétique:

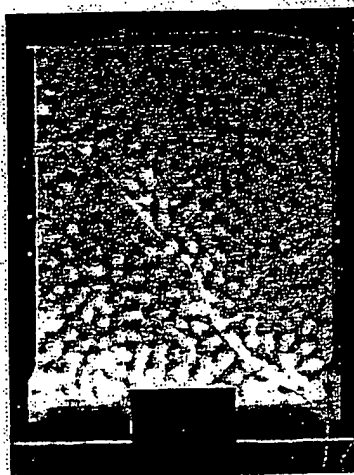
19 - Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent selon la revendication 17 ou 18.

1/2



200 nm

Fig. 1



50 nm

Fig. 2

2/2

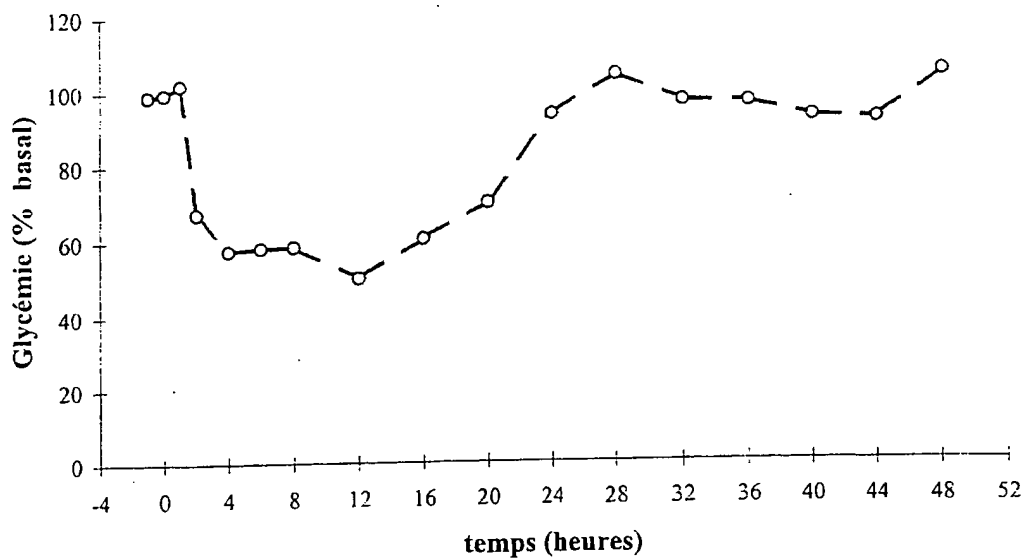


FIG.3

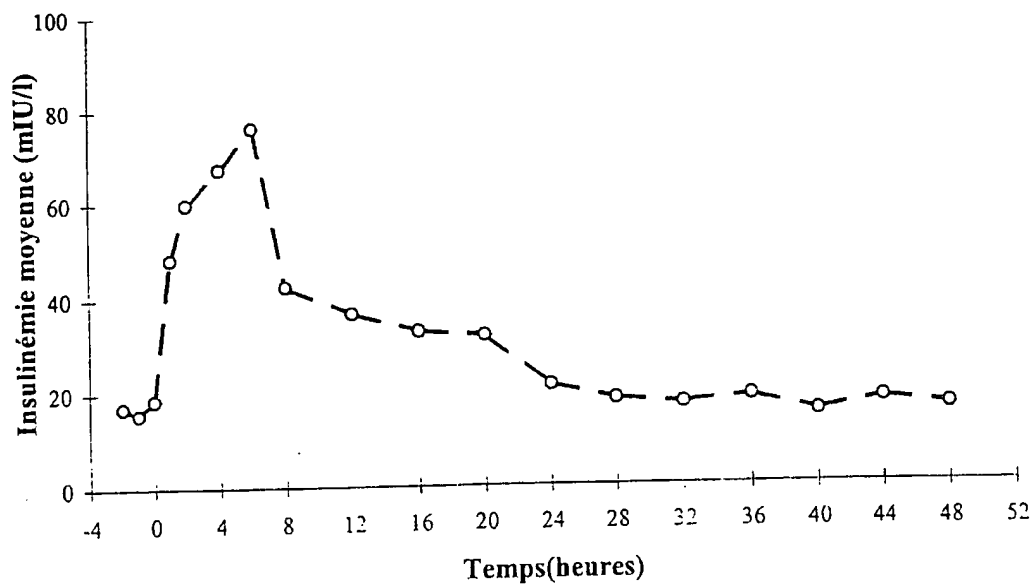


FIG.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K9/16 A61K9/51 B01J13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 746 035 A (FLAMEL TECH SA) 19 September 1997 (1997-09-19) claims; examples	1-18
A	US 5 904 936 A (HUILLE SYLVAIN ET AL) 18 May 1999 (1999-05-18) cited in the application	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2000

Date of mailing of the international search report

05/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Willsher, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2746035 A	19-09-1997	AU 2166097 A	10-10-1997
		CA 2249274 A	25-09-1997
		EP 0888110 A	07-01-1999
		WO 9734584 A	25-09-1997
		JP 2000507934 T	27-06-2000

US 5904936 A	18-05-1999	FR 2732218 A	04-10-1996
		AT 194490 T	15-07-2000
		AU 706746 B	24-06-1999
		AU 5337796 A	16-10-1996
		BR 9607863 A	30-06-1998
		CA 2215254 A	03-10-1996
		CN 1183040 A	27-05-1998
		DE 69609222 D	17-08-2000
		EP 0734720 A	02-10-1996
		WO 9629991 A	03-10-1996
		JP 11503118 T	23-03-1999
		NZ 305392 A	26-08-1998
		ZA 9602446 A	07-08-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02831

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K9/16 A61K9/51 B01J13/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K B01J		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 746 035 A (FLAMEL TECH SA) 19 septembre 1997 (1997-09-19) revendications; exemples ---	1-18
A	US 5 904 936 A (HUILLE SYLVAIN ET AL) 18 mai 1999 (1999-05-18) cité dans la demande -----	
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier 'Z' document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 27 novembre 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 05/12/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Willsher, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dém. Internationale No

PCT/FR 00/02831

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2746035	A	19-09-1997	AU 2166097 A	10-10-1997
			CA 2249274 A	25-09-1997
			EP 0888110 A	07-01-1999
			WO 9734584 A	25-09-1997
			JP 2000507934 T	27-06-2000
<hr/>				
US 5904936	A	18-05-1999	FR 2732218 A	04-10-1996
			AT 194490 T	15-07-2000
			AU 706746 B	24-06-1999
			AU 5337796 A	16-10-1996
			BR 9607863 A	30-06-1998
			CA 2215254 A	03-10-1996
			CN 1183040 A	27-05-1998
			DE 69609222 D	17-08-2000
			EP 0734720 A	02-10-1996
			WO 9629991 A	03-10-1996
			JP 11503118 T	23-03-1999
			NZ 305392 A	26-08-1998
			ZA 9602446 A	07-08-1996
<hr/>				